中華農業研究 28(3)：139～144(1979)

甘藷無病毒苗之培育及病毒檢定[1]

廖嘉信[2]　　鐘美麗[3]

摘要：感染毒素病葉部出現黃色斑點病徵之甘藷品種臺農 63 號，經 38～42°C 熱處理 30～90 天，切取莖頂 5 cm 長，扦插於培養土或熱處理 28 天以上，切取莖頂 5 mm 長，培養於改良式 Murashige and Skoog 培養基，均不能去除病毒。熱處理 28 天以上，切取莖頂 0.3～0.6 mm 培養於含 BAP (6-benzylaminopurine) 4-8 ppm 及 IAA (Indole-3-acetic acid) 1～2 ppm 之改良式 MS 培養基，溫度維持 25±1°C，光度 0～150 lux, 經 30～50 天後移置於不含生長素或含 Kinetin 2 ppm 之相同培養基，每日光照 16 小時，光度 3300 lux 以上，照光時溫度在 28～32°C 之間，未照光時溫度為 25±1°C，於 65～120 天可生長成一完全之小苗。以指示植物 *Iponoea nil* 採用機械傳播及嫁接法檢定，66.7 % (16/24) 呈無病毒反應。經檢定結果之無病毒試管苗，切取長度約 0.6～0.8 cm 包括一個節之莖，將葉片切除，扦插於改良式 MS 培養基，於 10～30 天內可生長成一完全之小苗。

植物經由熱處理(3,12,16)，莖頂培養(8,10,17,18)以去除病毒之例子頗多，去除甘藷病毒之嘗試有莖頂重複砂耕插植(4)，熱處理(5,6,15)，莖頂組織培養(2,13,15)等，但由於甘藷病毒未曾完全被瞭解，而且其病徵常有隱蔽現象 (masking)，只觀察病徵表現，無法確認其是否已去除病毒，故本研究嘗試以熱處理配合莖頂或頂端生長點培養，試管內無菌扦插繁殖，並進行病毒檢定等方法，以探討甘藷無病毒苗培育之可行性。

材料與方法

供試甘藷品種為臺農 63 號，葉部出現黃色斑點之甘藷毒素病株，取病株之塊根，用自來水洗淨表面塵污，加清潔的水草保持濕度，置 25°C 長芽後，改置於 38～42°C 植物生長箱，每日加光照 16 小時，光度 3,000 lux 以上，隔週噴一次萬力可濕性粉劑 (50% Benlate W. P.) 1,000 倍液，預防眞菌性病害，切取 1 mm 長度以下之莖頂或生長點行無菌培養時，則無須再行表面殺菌，若切取長度大於 1mm 則用 5% calcium hypochlorite 水溶液殺菌 10 分鐘，再用無菌水洗三次。基礎培養基用改良式 Murashige and Skoog's medium(14) (以下簡稱為 MMS 培養基)，其主成分為 (mg/ℓ)：NH_4NO_3 1,650，KNO_3 1,900，$CaCl_2$ $2H_2O$ 440，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 370，KH_2PO_4 170，Na_2 EDTA 37.3，$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 27.8，H_3BO_3 6.2，$MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 22.3，$ZnSO_4 \cdot 4H_2$ O8.6，KI 0.83，$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.25，$CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.025，$CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.025，thiamin hydrochloride 2, nicotinic acid 1，pyridoxine hydrochloride 1，folic acid 1，myo-inositol 100，sucrose 30,000，agar 7,500，以及供大蒜生長點培養用培養基(1)。培養用試管 10.5×2.5cm，每管裝培養基 10ml，以 15 lbs/in^2 殺菌 8 分鐘，殺菌前 pH 調整為 5.7，培養溫度 25±1°C，初期光照强度 0～150 lux，約 30 天後改為 3,300 lux 以上，每日光照

1. 臺灣省農業試驗所 研究報告 第 884 號。

2，3. 本所嘉義農業試驗分所技士、研究助理・臺灣省 嘉義市。

16 小時，照光時溫度提高到 28~32°C 。供病毒檢定之指示植物為 *Ipomoea nil* ，子葉完全長出時為機械接種最佳時期，如進行嫁接檢定，則於長出 4～6 片本葉時為之。檢定方法係取組織培養苗葉片加 20 倍之 0.1M pH 7.0 磷酸緩衝溶液 (w/v) 混合磨碎，取其汁液塗抹於撒佈 600 mesh 金鋼砂之指示植物葉片上，可檢定出經機械傳播之甘藷病毒，不能經機械接種檢定之病毒則用嫁接法[19]。

結　果

一、已發芽臺農 63 號

罹病株之塊根十個，經 38~42°C 熱處 30，60，90 天後，植株皆徒長，葉片縮小，捲曲，葉脈輕微突起（圖 4），每一塊根切取一 5 cm 長莖頂，扦插於培養土（砂土：堆肥＝3：1），置溫室中 (23~40°C) ，約一週後成活，成活株數分別為 9，8 與 8 株，約 2～3 週後可於葉片上觀察到明顯的黃色斑點之毒素病病徵，證明高溫未能達到不活化甘藷病毒之作用。

二、5mm 長莖頂無菌培養

病株經 38~42°C 熱處理 4 週後，切取莖頂 5 mm 長，培養於 MMS, ½ MMS（除洋菜外，各成份均為 MMS 之半量）或供大蒜生長點培養用之培養基[1]。結果如表 1 ，在 ½ MMS+1 ppm Indole-3-acetic acid (IAA) 中生長迅速，約 2 週內發根，30 天後植株生長良好，但葉部明顯地觀察到有黃色斑點毒素病病徵。

表 1. 5 mm 長之甘藷莖頂在不同培養基上之成活率

Table 1. The effect of media on the terminal growth of 5mm cuttings taken from virus infected *Ipomoea batatas* cv. Tainung 63 in growth chamber held continuously at 38°~42°C for four weeks.

培養基 Medium	供試株數 No. test plants	感染雜菌株數 No. plants contaminated	成活株數 No. plants survived
½MMS[a]+1ppm IAA	20	1	17
MMS+1ppm IAA	20	2	10
A[b]+1ppm IAA	20	2	5

a. 各組成分（除洋菜以外）為改良式 Murashige and skoog 培養基之半量。

Modified Murashige and skoog's medium at ½ strength for all components, except agar.

b. 供大蒜莖頂生長點培養用培養基

Medium for culturing shoot meristem of *Allium sativum* after Wang and Huang, 1974

三、0.3~0.6 mm 長莖頂無菌培養

病株經 38~42°C 熱處理 4 週後，切取莖頂 0.3~0.6mm 長，包括生長點及 1～2 原葉體，培養於 MMS+6-benzylaminopurine (BAP) 4~8 ppm 及 IAA 1~2 ppm ，結果有 54 % (54／100) 生長點褐化， 10 %感染雜菌，其餘可長出黃褐色癒合組織，直徑達 0.4 cm 時移置於不加生長素之 MMS 培養基或 MMS+Kinetin 2 ppm, 65~120 天內長成 2~5cm 長可供移植之小苗（圖 1），供小苗移植之培養土，水草，蛭石或砂土，均經蒸氣殺菌，維持土內溫度 70°C 以上， 30 分鐘。可供移植之試管苗只以自來水洗淨表面沾附之培養基，或經自來水洗淨後再經萬力可濕性粉劑 1,000 倍液浸漬 15 分鐘，種植於直徑 10.5cm 之素燒盆，上面罩以小燒杯，以保持高溼，約一週後去除之，可得 90 %以上之成活率，其生長情形則以培養土種植者為最佳。成活之植株每隔

半個月行病毒檢定一次，連續三次以上，結果有 66.7 % (16／24) 呈無病毒反應。

四、無病毒苗之保存及迅速繁殖

經人工檢定呈無病毒反應之試管培養苗，種植於溫室，如以人工接種甘藷病毒，約 2 週後即可發病。若管理不當，極易由綠桃蚜或粉蝨等之傳播，再感染病毒，故經檢定之無病毒試管苗，可於試管內再行無性繁殖，以利保存，其方法如下；切取包括一個節之 0.6～0.8 cm 長試管苗之莖，將葉片切除，扦插於 MMS 或 MMS+0.5 ppm IAA (圖 2)，在 10～15 天內可長成一完全之小苗，30 天內可長到 5cm 長以上，包括 5～6 個節，可繼續分切，再行試管內扦插，繁殖簡便迅速。

討　　論

甘藷毒素病病毒種類頗為複雜，到目前為止尚未能完全了解，無法以血清法鑑定，因此利用指示植物乃為目前可行之病毒檢定法。據報告熱處理對去除甘藷黃萎型毒素病有效[5]，但對塊根內部木栓化 (Internal cork)[11] 及 Russet crack[7] 則無效，本試驗以 38～42°C 熱處理未能使黃色斑點型甘藷病毒不活化。

甘藷莖頂或生長點組織培養，常遭遇雜菌感染的困擾[9,13]，本試驗以塊根發芽為供試材料或以田間病株先經滲透性殺菌劑處理 (50% Benlate W. P. 1,000 倍液)，可維持感染雜菌率在 10% 以下。

熱處理 4 週後，切取莖頂 0.3～0.6 mm 長培養，經檢定結果有 66.7% 為無病毒苗，其比例大於 Alconero[2] 之 47%，原因可能是本試驗供試材料先經熱處理及切取較小的莖頂之故。但事實上只要培養出一株無病毒甘藷試管苗，即可同時利用試管內無菌扦插法及防蟲之繁殖圃內行一般田間之扦插法迅速繁殖。

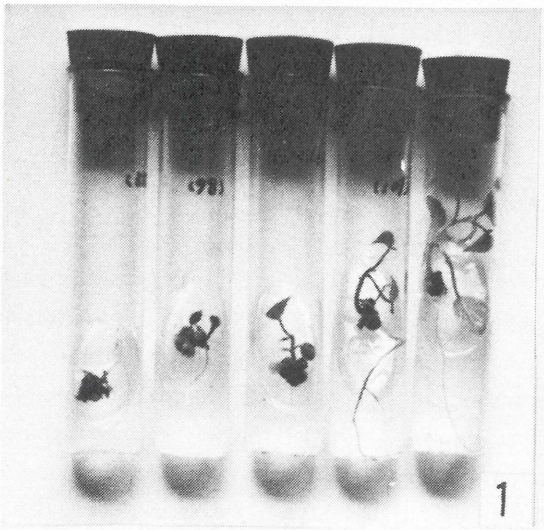
誌謝：本研究承中央加速農村建設計畫 78 (ARDP) -5.1A-337補助經費，組織培養工作承中央研究院王博士博仁技術指導，嘉義農業試驗分所李所長良鼎力支持，文成復蒙恩師邱人璋博士斧正，謹致最眞誠之謝意。

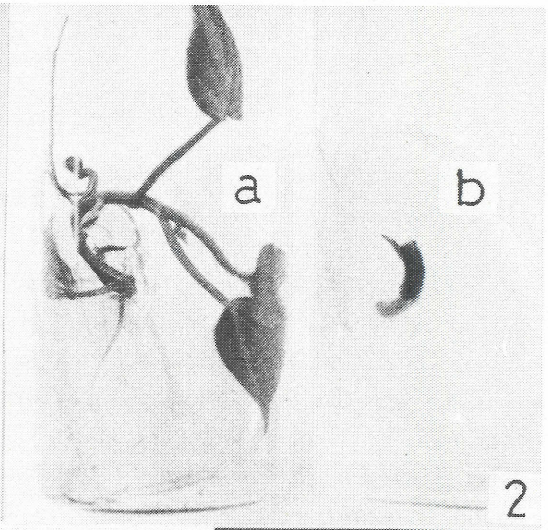
參　考　文　獻

1. 王博仁、黃麗春． 1974．大蒜莖頂生長點培養．中國園藝 20(2)：79-87。
2. 廖嘉信、簡義忠、鐘美麗、邱人璋、韓又新、 1979. 臺灣甘藷毒素病之研究．Ｉ．甘藷、黃斑型毒素病。中華農業研究 28 (3)：127-138
3. Alconero, R., A. M. Santiago, F. Morales and F. Rodriguez. 1975. Meristem tip culture and virus indexing of sweet potatoes. Phytopathology 65 : 769-773.
4. Baxter, L. W. and N. E. McGlohon. 1959. A method of freeing white clover plants of bean mosaic virus. Phytopathology 49 : 810-811.
5. Hildebrand, E. M. 1957. Freeing sweet potato varieties from cork virus by propagation with tip cuttings. Phytopathology 47 : 452 (Abstr.)
6. Hildebrand, E. M. and P. Brierley. 1960. Heat treatment eliminates yellow dwarf virus from sweet potatoes. Plant Dis. Reptr. 44 : 707-709.
7. Hildebrand. E. M. 1964. Heat treatment for eliminating internal cork viruses from sweet potato plants. Plant Dis. Reptr. 48 : 356-358.
8. Hildebrand, E. M. 1967. Russet crack-A menace to the sweet potato industry. I. Heat therapy and symptomatology. Phytopathology 57 : 183-187.
9. Hollings, M. 1965. Diseases control through virus-free stock. Ann. Rev. Phytopath. 3 : 367-396.
10. Hollings. M., M. Stone and K. R. Bock. 1976. Purification and properties of sweet potato mild mottle, a white-fly borne virus from sweet potato (*Ipomoea batatas*) in East Africa.

Ann. Appl. Biol. 82 : 511-528.

11. Kartha, K. K. and O. L. Gamborg. 1975. Elimination of cassava mosaic disease by meristem culture. Phytopathology 65 : 826-828.
12. Martin, W. J. 1962. Attempts to eliminate sweet potato internal cork virus by heat treatments. Plant Dis. Reptr. 46 : 19-20.
13. Mellor, F. C. and R. Stace Smith. 1967. Eradication of potato virus X by thermotherapy. Phytopathology 57 : 674-678.
14. Mori, K., E. Hamaya, T. Shimomura and Y. Okegami. 1969. Production of virus-free plants by means of meristem culture. Jour. Centr. Agric. Expt. Stat. No. 13. (In Japaness)
15. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Phys. Plant. 15 : 473-497.
16. Nielsen, L. W. 1960. Elimination of the internal cork virus by culturing apical meristems of infected sweet potatoes. Phytopathology 50 : 840-841.
17. Stace-Smith, R. and F. C. Mellor. 1968. Eradication of potato virus X and S by thermotherapy and axillary bud culture. Phytopathology 58 : 199-203.
18. Wang, P. J. and L. C. Huang. 1975. Cullus cultures from potato tissues and the exclusion of potato virus X from plants regenerated from stem tips. Can. J. Bot. 53 : 2565-2567.
19. Yang, H. J. and W. T. Clore. 1976. Obtaining virus-free plants of *Asparagus officinalis* L. by culturing shoot tips and apical meristems. Hortscience 11 : 474-475.





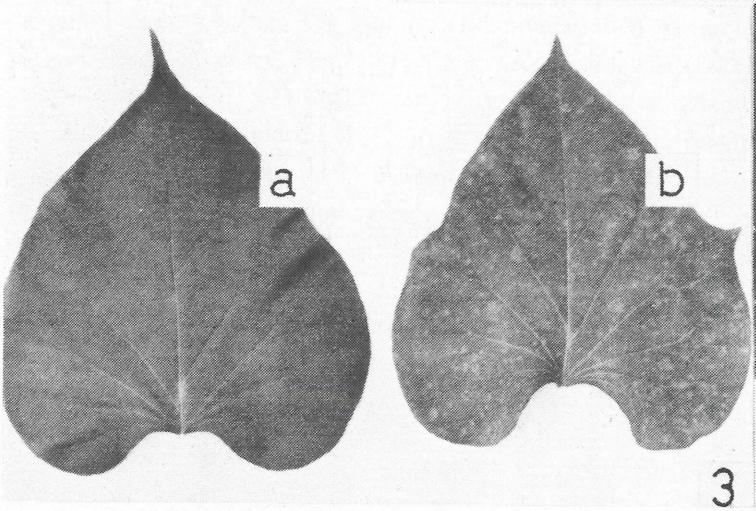


圖 1. 莖頂培養40，60，70，80，90天。**圖 2.** 甘藷無病毒苗試管內扦插繁殖 a. 培養第 15 天，b. 第 1 天。**圖 3.** 經由莖頂培養得到之臺農 63 號甘藷無病毒苗葉片。**圖 4.** 臺農63號甘藷經 38°～42°C 熱處理 50 天後，葉片捲曲、縮小。

Fig. 1. Shoot tip after 40, 60, 70, 80, 90, days culture. **Fig. 2.** Virus-free planting in the test tube. a. after 15 days culture. b. the first day culture. **Fig. 3.** a. A leaf from virus-free plant which was derived from shoot tip culture. b. Virus diseased sweet potato cultivar Tainung 63. **Fig. 4.** Leaves of sweet potato cultivar Tainung 63 showing leaf rolling, crinkling after heat treatment at 38°-42°C for 50 days.

Shoot tip culture and virus indexing in sweet potato [1]

Chia-hsin Liao and Mei-lie Chung [2]

Summary

Keeping 50mm long terminal growths in growth chamber at 38°-42°C continuously for 30 to 90 days with a daily light peroid of 16 hours at 3300 lux light intensity failed to eliminate a yellow spotting virus from sweet potato cultivar Tainung 63. Neither was the virus eliminated by culturing shoot tips, 5mm in length, in modified Murashige and Skoog's medium (MS). However, elimination of the virus was achieved by culturing meristem tips, 0.3 to 0.6mm long, taken from virus-infected Tainung 63 which had previously been exposed to 38°-42°C for 28 days. The meristem cultures were grown initially in modified MS medium containing 4-8 ppm 6-benzylaminopurine (BAP) and 1-2 ppm indoleacetic acid (IAA) and were placed under 25 ±1°C for 30 to 50 days at a light intensity of 150 lux or below. Then they were transferred to modified MS with 2 ppm kinetin. A daily light peroid of 16 hours at 3300 lux light intensity and a dark period of 8 hours were provided. The temperatures during the alternative peroids were 28-32°C and 25±1°C, respectively. The excised meristem tissues developed into plantlets within 65 to 120 days. Of 24 such plants, 16 did not cause virus symptoms on *Ipomoea nil* by mechanical transmission and/or grafting. Single-node cuttings of these virus-free test tube plantlets developed into complete plants within 10 to 30 days after subculturing on modified MS medium.

---

1. Contribution No. 884 from the Taiwan Agricultural Research Institute.

2. Plant pathologist and Research asistant, respectively, Chiayi Agricultural Experiment station, TARI. Chiayi City , Taiwan 600, ROC.